

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 28 février 2020

AVIS
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003 du colza génétiquement modifié LBFLFK développé pour avoir un profil modifié en acides gras (oméga-3 LC-PUFAs) et être tolérant aux herbicides de type imidazolinone pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-DE-2019-157)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 3 décembre 2019 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003 du colza génétiquement modifié LBFLFK développé pour avoir un profil modifié en acides gras (oméga-3 LC-PUFAs) et être tolérant aux herbicides de type imidazolinone pour l'importation, la transformation ainsi que l'utilisation en alimentation humaine et animale de cet OGM (dossier n° EFSA-GMO-DE-2019-157).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Conformément au Règlement (CE) n° 1829/2003, notamment aux articles 6 et 18, l'Autorité européenne de sécurité des aliments/European Food Safety Authority (EFSA) est chargée de procéder à l'évaluation des dossiers concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux issus de plantes génétiquement modifiées et de rendre un avis à la Commission Européenne. L'EFSA a cependant offert la possibilité aux États membres de faire connaître leurs observations sur les dossiers initiaux. C'est dans ce cadre que la DGCCRF a sollicité l'avis de l'Anses.

Le Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 s'applique pour ce dossier.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été effectuée par le Groupe de Travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 16 janvier 2020 et les 18 et 19 février 2020 sur la base de rapports initiaux rédigés par six rapporteurs. Elle a été conduite en se basant sur les documents guides du panel GMO de l'EFSA (2006 et 2011) ainsi que sur les éléments complémentaires jugés nécessaires par les experts du GT « Biotechnologie ».

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

Les sections, telles que définies dans le formulaire de commentaires de l'EFSA, sont reprises ci-dessous.

PARTIE I - INFORMATIONS GÉNÉRALES

Le colza (*Brassica napus*) est une brassicacée annuelle à fleurs jaunes issue du croisement naturel entre un chou (*B. oleracea*) et une navette (*B. rapa*). En 2018 (FAOStat¹), les dix premiers pays producteurs de colza sont le Canada, la Chine, l'Inde, la France, l'Australie, l'Allemagne, l'Ukraine, la Pologne, le Royaume-Uni et la Russie qui représentent plus de 85 % de la production mondiale. La production mondiale était de 75 001 457 tonnes (FAOStat) et en 2017, 29 % du colza cultivé était génétiquement modifié (ISAAA², 2018).

Le colza est l'une des principales plantes à huile produites en Europe. Seule la graine de colza est utilisée en alimentation. Elle est transformée en huile et en tourteau (co-produit de l'extraction de l'huile). L'huile de colza est utilisée pour l'alimentation humaine et animale et pour la production de biocarburants. Le tourteau de colza est utilisé en alimentation animale. Les lipides et les protéines représentent environ 60 % du poids des graines. La graine de colza contient aussi des substances antinutritionnelles, des glucosinolates, des composés phénoliques (sinapine, tannins) et de l'acide phytique. A l'heure actuelle, toutes les variétés de colza destinées à l'alimentation humaine sont dépourvues d'acide érucique et pauvres en glucosinolates (variétés dites « double zéro »).

Le colza LBFLFK a été génétiquement modifié afin d'introduire dans son génome les cassettes d'expression portant le gène codant une acétohydroxyacide synthétase [AHAS(At)[A122T S653N]] et dix gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (LC-PUFA), sept désaturases et trois élongases : une delta-12-désaturase [D12D(Ps)], une delta-6-désaturase [D6D(Ot)], une delta-5-désaturase [D5D(Tc)] deux delta-4-désaturases [D4D(Tc) et D4D(Pi)], deux oméga-3 désaturases [O3D(Pi) et O3D(Pir)], une delta-5-élongase [D5E(Ot)] et deux delta-6-élongases [D6E(Tp) et D6E(Pp)].

Les enzymes du métabolisme lipidique insérées dans le colza LBFLFK permettent la métabolisation de l'acide oléique (C18:1 n-9) synthétisé de façon endogène dans le colza, en

¹ <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

² International service for the acquisition of agri-biotech applications

acides gras polyinsaturés à longue chaîne (LC-PUFA), acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) et acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3).

La protéine AHAS est une enzyme de la voie de biosynthèse des acides aminés ramifiés (valine, leucine et isoleucine), cible des herbicides de type imidazolinone. Le changement de deux acides aminés conduisant à la protéine AHAS mutée, AHAS(At)[A122T S653N], exprimée dans le colza LBFLFK, confère à celui-ci une tolérance aux herbicides de type imidazolinone. Cette tolérance est utilisée pour sélectionner les plantes transformées.

Ce dossier correspond à une première demande d'autorisation de mise sur le marché pour l'importation, la transformation et l'utilisation en alimentation humaine et animale du colza LBFLFK. Il ne concerne pas sa mise en culture. Si ce colza venait à être importé, il devrait satisfaire à la réglementation européenne relative aux limites maximales de résidus de produits phytopharmaceutiques.

PARTIE II - INFORMATIONS SCIENTIFIQUES

II.1. Identification et caractérisation des dangers

II.1.1. Informations concernant les plantes réceptrices ou (le cas échéant) parentales

La transformation génétique a été réalisée sur la variété de colza (*Brassica napus*) non transgénique Kumily.

II.1.2. Caractérisation moléculaire

II.1.2.1. Informations concernant la modification génétique

La transformation génétique a été effectuée à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* sur des hypocotyles de colza.

Des segments d'hypocotyles de colza ont été prélevés et co-cultivés avec la souche SHA001 d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche désarmée de son pouvoir pathogène, porteuse du vecteur LTM593 qui contient l'ADN-T, et du plasmide helper pRi2659 Δ tet portant les gènes de virulence nécessaires au transfert de l'ADN-T dans les cellules de la plante.

Après cette co-culture, les hypocotyles ont été transférés sur milieu de croissance en présence de carbénicilline (élimination des *A. rhizogenes* résiduelles) puis sur milieu sélectif contenant un herbicide de type imidazolinone (sélection des pousses transformées). Les pousses ont ensuite été transférées sur un milieu permettant la différenciation de plantules (génération T0). Ces plantes transformées (génération T0) ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire et d'une analyse de la composition en acides gras de graines. Les plantes de générations T1 et T2 ont aussi fait l'objet de sélection sur leurs caractéristiques moléculaires et phénotypiques pour retenir une lignée génétiquement modifiée LBFLFK.

Le plasmide LTM593 utilisé pour la transformation porte treize cassettes d'expression entre les bordures gauche et droite d'un même ADN-T (44010 pb). Elles correspondent à la cassette d'expression du gène *c-AHAS(At)* et aux cassettes d'expression de 10 gènes impliqués dans le métabolisme lipidique : *c-D12D(Ps)*, *c-D6D(Ot)*, *c-D6E(Tp)*, *c-D6E(Pp)*, *c-D5D(Tc)*, *c-O3D(Pi)*, *c-O3D(Pir)*, *c-D5E(Ot)*, *c-D4D(Tc)* et *c-D4D(Pl)*. Deux cassettes d'expression différentes coexistent dans le plasmide pour les gènes *c-D5D(Tc)* et *c-O3D(Pir)*.

Les raisons conduisant le pétitionnaire à placer dans l'ADN-T des duplications de gènes [*c-D5D(Tc)* et *c-O3D(Pir)*] ainsi que trois couples de gènes d'origines différentes codant trois activités enzymatiques (D6E, O3D et D4D) ne sont pas argumentées dans le dossier.

Les organismes sources des séquences de désaturases et d'élongases sont des micro-algues marines (*Ostreococcus tauri*, *Pavlova lutheri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Thraustochytrium* sp.),

des oomycètes (*Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae* et *Pythium irregulare*) et une mousse (*Physcomitrella patens*). L'organisme source de la séquence de l'acétohydroxyacide synthétase [AHAS(*At*)] est *Arabidopsis thaliana*.

Les séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques codantes présentes dans l'ADN-T du plasmide sont identiques aux séquences des protéines présentes dans les organismes donneurs sauf pour deux protéines. Dans la protéine D6E(*Tp*), la proline en position 196 indiquée dans la séquence de référence est remplacée par une sérine mais cet acide aminé n'est pas associé à un domaine fonctionnel de l'enzyme. La substitution est sans conséquence attendue pour l'activité enzymatique. La protéine AHAS(*At*)[A122T S653N] comporte deux substitutions d'acides aminés : une alanine en thréonine en position 122 et une sérine en asparagine en position 653. Ces substitutions d'acides aminés dans la protéine AHAS(*At*) conduisent à diminuer l'affinité de liaison entre cette protéine et les herbicides de type imidazolinone, conférant ainsi une tolérance au colza LBFLFK à ces herbicides d'intérêt.

Concernant les séquences promotrices utilisées, le promoteur du gène *c-AHAS(At)* est un promoteur constitutif et ubiquitaire et les promoteurs utilisés pour les enzymes du métabolisme lipidique permettent une expression tissu-spécifique dans la graine.

Les séquences codantes des différents gènes ont été optimisées pour tenir compte de l'usage préférentiel des codons chez le colza. Les séquences ont aussi été modifiées pour éviter la génération d'éléments non recherchés (ORF supplémentaires, séquences de régulation, régions riches en AT ou en GC).

Le tableau 1 résume le contenu des différentes cassettes d'expression présentes dans l'ADN-T.

Tableau 1 : Informations concernant le gène d'intérêt, l'organisme donneur de ce transgène et les séquences non codantes présentes dans la cassette d'expression.

Gène	Organisme donneur du transgène	Contenu de la cassette d'expression (en plus de la séquence codante indiquée dans la 1 ^{ère} colonne)
<i>c-D12D(Ps)</i> gène d'une delta-12 désaturase	<i>Phytophthora sojae</i>	Promoteur d'un gène d'une protéine de stockage de la graine de <i>Brassica napus</i> , séquences introniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et séquence de polyadénylation et de terminaison de la petite sous-unité de la RuBisCO de <i>Pisum sativum</i>
<i>c-D6D(Ot)</i> gène d'une delta-6 désaturase	<i>Ostreococcus tauri</i>	Promoteur d'un gène d'une protéine spécifique de la graine de <i>Vicia faba</i> , séquences introniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et séquence de polyadénylation et de terminaison du gène d'un inhibiteur de la cathepsine D de <i>Solanum tuberosum</i>
<i>c-D6E(Tp)</i> gène d'une delta-6 élongase	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Promoteur d'un gène d'une protéine spécifique de la graine de <i>Linum usitatissimum</i> , séquences introniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et séquence de polyadénylation et de terminaison d'une protéine d' <i>Arabidopsis thaliana</i>

Gène	Organisme donneur du transgène	Contenu de la cassette d'expression (en plus de la séquence codante indiquée dans la 1 ^{ère} colonne)
<i>c-D6E(Pp)</i> gène d'une delta-6 élongase	<i>Physcomitrella patens</i>	Promoteur d'un gène d'une protéine spécifique de la graine de <i>Vicia faba</i> , séquences introniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et séquence de polyadénylation et de terminaison de l'ARN 35S du génome du virus de la mosaïque du chou-fleur
<i>c-D5D(Tc)</i> gène d'une delta-5 désaturase	<i>Thraustochytrium</i> sp.	Promoteur du gène de la conline de <i>Linum usitatissimum</i> , séquences introniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et séquence de polyadénylation et de terminaison du gène de l'octopine synthétase d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>c-D5D(Tc)</i> gène d'une delta-5 désaturase	<i>Thraustochytrium</i> sp.	<u>Seconde cassette d'expression pour le gène <i>c-D5D(Tc)</i>:</u> Promoteur et terminateur du gène d'une protéine spécifique de la graine de <i>Brassica napus</i>
<i>c-O3D(Pi)</i> gène d'une oméga-3 désaturase	<i>Phytophthora infestans</i>	Promoteur d'un gène d'une protéine spécifique de la graine de <i>Vicia faba</i> , séquences introniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et séquence de polyadénylation et de terminaison de l'ARN 35S du génome du virus de la mosaïque du chou-fleur
<i>c-O3D(Pir)</i> gène d'une oméga-3 désaturase	<i>Pythium irregulare</i>	Promoteur et terminateur du gène d'une protéine spécifique de la graine de <i>Brassica napus</i>
<i>c-O3D(Pir)</i> gène d'une oméga-3 désaturase	<i>Pythium irregulare</i>	<u>Seconde cassette d'expression pour le gène <i>c-O3D(Pir)</i>:</u> Promoteur d'un gène d'une protéine spécifique de la graine de <i>Linum usitatissimum</i> , séquences introniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et séquence de polyadénylation et de terminaison d'une protéine d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>c-D5E(Ot)</i> gène d'une delta-5 élongase	<i>Ostreococcus tauri</i>	Promoteur et terminateur du gène d'une élongase de <i>Brassica napus</i> , séquences introniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et séquence de polyadénylation et de terminaison du gène d'une élongase d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>c-D4D(Tc)</i> gène d'une delta-4 désaturase	<i>Thraustochytrium</i> sp.	Promoteur et terminateur du gène d'une protéine spécifique de la graine, Arceline-5, de <i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>c-D4D(PI)</i> gène d'une delta-4 désaturase	<i>Pavlova lutheri</i>	Promoteur du gène de la conline de <i>Linum usitatissimum</i> , séquences introniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et séquence de polyadénylation et de terminaison du gène de l'octopine synthétase d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Gène	Organisme donneur du transgène	Contenu de la cassette d'expression (en plus de la séquence codante indiquée dans la 1 ^{ère} colonne)
<i>c-AHAS(At)</i> gène d'une acétohydroxyacide synthétase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Promoteur constitutif et séquences introniques de l'ubiquitine de <i>Petroselinum crispum</i> et terminateur du gène de l'acétohydroxyacide synthétase d' <i>Arabidopsis thaliana</i>

II.1.2.2. Informations concernant la plante génétiquement modifiée

L'analyse des données de NGS (Next generation sequencing) a permis de déterminer le nombre de sites d'insertion de l'ADN-T et le nombre de copies d'ADN-T insérées, de rechercher la présence de séquence plasmidique en dehors de l'ADN-T et d'évaluer la stabilité de l'ADN inséré au cours de 5 générations (T3, T4, T5, T6 et T7).

La détermination des loci d'insertion et de la nature des séquences d'ADN-T inséré présentes dans le génome du colza LBFLFK (génération T3) a été réalisée après PCR et séquençage direct par la technique de Sanger. Ces données de séquençage ont été analysées *in silico* afin de caractériser également les ORF présents au sein de l'ADN intégré et aux niveaux des jonctions avec le génome du colza.

L'analyse des résultats obtenus montre une insertion de deux copies de l'ADN-T sur deux chromosomes différents, dans le génome du colza, sans insertion de séquence du plasmide hors ADN-T. Les inserts seront nommés inserts 1 et 2 pour une facilité d'écriture.

Les amplifications par PCR suivies du séquençage des régions flanquantes en 5' et en 3' des inserts 1 et 2 pour le colza LBFLFK et son témoin isogénique Kumily mettent en évidence :

- Pour l'insert 1 :
 - o au niveau du site d'insertion, des délétions de 184 pb de la bordure droite et de 72 pb de la bordure gauche de l'ADN-T ainsi qu'une délétion de 8 pb du génome de colza. Un réarrangement de 64 pb dans la bordure droite de l'ADN-T est constaté ainsi que la modification de 3 nucléotides.
 - o une identité de séquence de l'ADN-T en dehors de 2 nucléotides. La mutation d'un nucléotide dans la séquence codante de la protéine D12D(*Ps*) conduit à la substitution d'une phénylalanine en leucine en position 83, sans conséquence sur l'activité enzymatique et un changement d'un nucléotide dans la séquence promotrice du gène *c-O3D(Pir)*.
- Pour l'insert 2 :
 - o au niveau du site d'insertion, des délétions de 184 pb de la bordure droite et de 53 pb de la bordure gauche de l'ADN-T ainsi qu'une délétion de 31 pb du génome de colza et un ajout de 2 pb en 5' et de 4 pb en 3' de l'intégration de l'ADN-T.
 - o une identité de séquence de l'ADN-T en dehors d'un nucléotide dans la séquence codante de la protéine D4D(*Pi*) qui génère une substitution d'une alanine en serine en position 102, sans conséquence sur l'activité enzymatique.
- L'absence de séquences issues du vecteur plasmidique est confirmée pour les deux insertions d'ADN-T.

Les analyses bioinformatiques des cadres ouverts de lecture (ORF) potentiels au niveau des quatre jonctions et des deux ADN-T intégrés ne mettent en évidence aucune identité totale, globale ou locale avec des protéines toxiques ou allergéniques connues (2019). Ces analyses bioinformatiques confirment aussi que les deux insertions de l'ADN-T n'ont pas interrompu de gène identifié dans le colza.

Le colza LBFLFK et son témoin isogénique Kumily ont été cultivés sur 4 sites aux USA en 2016 avec ou sans traitement avec un herbicide d'intérêt de type imidazolinone. Les teneurs en protéines D6D(*Ot*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), O3D(*Pi*), O3D(*Pir*), D6E(*Tp*) et AHAS(At)[A122T S653N] ont été quantifiées par western blot et celles en protéines D12D(*Ps*), D5D(*Tc*), D6E(*Pp*) et D5E(*Ot*) par ELISA dans des graines immatures (stades précoces, BBCH 75-79) et matures (BBCH 99) sur la génération T5B. Les teneurs en protéines n'ont pas été mesurées dans les autres parties de la plante, le pétitionnaire ne revendiquant pas une autorisation pour le fourrage.

Le tableau 2 présente les teneurs en protéines exogènes dans les graines de colza LBFLFK.

Tableau 2 : Moyennes et écarts-types des teneurs en protéines mesurées aux stades immatures (I) ou matures (M) pour les graines de colza LBFLFK non traité ou traité avec un herbicide d'intérêt de type imidazolinone, et exprimées en µg/g de matière sèche.

Protéine exogène	D12D(<i>Ps</i>)		D6D(<i>Ot</i>)		D5D(<i>Tc</i>)		D4D(<i>Tc</i>)		D4D(<i>Pl</i>)		O3D(<i>Pi</i>)		O3D(<i>Pir</i>)	
	I	M	I	M	I	M	I	M	I	M	I	M	I	M
Colza non traité Moyenne (écart-type)	5,49 (3,35)	0,83 (0,29)	33,90 (27,00)	27,72 (12,47)	ND	<LOQ	ND	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	108,14 (36,18)	171,53 (58,53)
Colza traité Moyenne (écart-type)	4,24 (2,77)	0,80 (0,27)	27,13 (23,53)	26,83 (9,16)	ND	<LOQ	ND	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	86,54 (31,79)	172,56 (51,18)

Protéine exogène	D5E(<i>Ot</i>)		D6E(<i>Tp</i>)		D6E(<i>Pp</i>)		AHAS(At)[A122T S653N]	
	I	M	I	M	I	M	I	M
Colza non traité Moyenne (écart-type)	<LOQ	6,94 (2,79)	829,94 (271,32)	679,42 (132,94)	ND	ND	11,30 (3,78)	3,19 (0,27)
Colza traité Moyenne (écart-type)	ND	7,58 (2,56)	826,70 (261,32)	682,75 (100,10)	ND	ND	11,54 (3,53)	3,31 (0,45)

LOQ = limite basse de quantification

ND = non détectable

La protéine AHAS(At)[A122T S653N] est mesurable dans les graines immatures et matures. Concernant les enzymes du métabolisme lipidique, les protéines D12D(*Ps*), D6D(*Ot*), O3D(*Pir*) et D6E(*Tp*) sont quantifiables dans les graines immatures et matures, la protéine D5E(*Ot*) seulement dans les graines matures (<LOQ dans les graines immatures) et les protéines D5D(*Tc*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), O3D(*Pi*) et D6E(*Pp*) sont soit non quantifiables, soit non détectables dans les graines. Les protéines D5D et D4D sont non détectables dans les graines de colza LBFLFK. Toutefois, leurs activités enzymatiques sont révélées par la présence d'acide arachidonique (C20:4 n-6) pour la D5D et par la présence de DHA (C22:6 n-3) pour la D4D. Bien que la synthèse des protéines O3D(*Pi*) et D6E(*Pp*) paraisse faible, les activités enzymatiques O3D et D6E sont présentes grâce à l'expression des gènes codant une activité enzymatique similaire d'origine différente, O3D(*Pir*) et D6E(*Tp*). Le pétitionnaire constate l'absence d'expression détectable et ou quantifiable de cinq protéines mais ne commente pas les raisons potentielles de ces absences.

Les niveaux d'expression des protéines dans les graines ne sont pas modifiés, que la plante soit traitée ou non avec l'herbicide d'intérêt de type imidazolinone.

L'analyse de ségrégation des deux inserts réalisée par PCR sur 3 générations (F2, F3 et F4) permet de conclure que les deux loci sont transmis de manière indépendante et à égale fréquence selon le principe d'une ségrégation mendélienne. La stabilité génétique des 2 loci d'insertion de l'ADN-T dans le génome du colza LBFLFK a été confirmée au sein des générations T4, T5, T6 et T7 par NGS. La stabilité phénotypique de la tolérance à l'herbicide d'intérêt et de l'existence d'un

profil en acides gras modifié dans les graines du colza LBFLFK a été démontrée dans les quatre mêmes générations. Toutefois, selon le GT « Biotechnologie », la complexité de l'ADN-T et sa double insertion serait susceptible de conduire à une instabilité du phénotype dans les générations futures.

II.1.2.4. Conclusions de la caractérisation moléculaire

Les éléments présentés dans le dossier concernant la caractérisation moléculaire du colza LBFLFK ne soulèvent pas de question particulière liée à l'utilisation de ce colza en alimentation animale ou humaine. Toutefois, des précisions seraient souhaitables sur les raisons conduisant le pétitionnaire à placer dans l'ADN-T des duplications de gènes de même origine [*c-D5D(Tc)* et *c-O3D(Pir)*] et trois couples de gènes d'origines différentes codant trois activités enzymatiques (D6E, O3D et D4D) ainsi que des argumentations sur l'absence d'une expression détectable ou quantifiable pour cinq des protéines exogènes.

II.1.3. Evaluation comparative

II.1.3.1. Choix de l'équivalent non transgénique et des comparateurs supplémentaires

Le colza LBFLFK est comparé à un témoin isogénique, Kumily. Six variétés commerciales conventionnelles non transgéniques ont été utilisées comme témoins dans les différents essais réalisés en 2016.

II.1.3.2. Dispositif expérimental et analyse statistique des données issues des essais au champ pour l'analyse comparative

Le colza LBFLFK, la variété témoin isogénique et les variétés commerciales (6 variétés par site) ont été cultivés en 2016 sur 14 sites aux USA pour l'analyse de composition et des caractéristiques phénotypiques et agronomiques. Ces sites sont indiqués par le pétitionnaire comme représentatifs de la production de colza. Le GT « Biotechnologie » note toutefois que le positionnement des sites expérimentaux déborde largement de l'aire principale de production du colza aux Etats Unis. Chaque modalité (variété isogénique, variétés commerciales et variété génétiquement modifiée) a été répétée cinq fois sur chaque site selon un plan d'expérience en blocs randomisés. Pour la variété génétiquement modifiée, deux modalités sont réalisées : soit les plantes subissent les mêmes traitements classiques que les variétés témoins, soit elles reçoivent en plus un traitement avec un herbicide d'intérêt de type imidazolinone. Les caractéristiques de ce plan d'expérience respectent les recommandations du Panel GMO de l'EFSA (2011).

Deux sites d'essais ont été retirés en raison de conditions climatiques défavorables. Les analyses phénotypiques et agronomiques ont été réalisées sur les 12 sites ainsi que le prélèvement d'échantillons pour les analyses de composition.

Les caractéristiques agronomiques, phénotypiques et de composition sont comparées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA) réalisées avec un modèle linéaire à effets mixtes incluant :

- un effet fixe "génotype" (indiquant s'il s'agit du colza LBFLFK traité ou non avec l'herbicide d'intérêt, de la variété témoin ou des variétés commerciales de référence),
- des effets aléatoires : "site", "bloc dans le site" et "variété commerciale".

Le modèle statistique utilisé, qui inclut un effet fixe "génotype" et un effet aléatoire "variété commerciale" correspond à celui proposé par le Panel GMO de l'EFSA (2010).

Les interactions génotype/site sont également analysées.

Le colza LBFLFK traité et non traité avec un herbicide d'intérêt est comparé à la variété témoin isogénique par des tests de différence et aux variétés commerciales de référence par des tests d'équivalence. L'erreur de type 1 retenue par le pétitionnaire est de 10 % pour les tests de différence et de 5 % pour les tests d'équivalence. Les résultats des tests statistiques sont interprétés selon l'approche décrite par le Panel GMO de l'EFSA (2010), en classant les variables

en 4 catégories selon les résultats des tests d'équivalence et 7 types après combinaison avec les résultats des tests de différence.

L'ensemble des modèles et méthodes est décrit dans les annexes. Les données brutes sous format électronique et les programmes de calcul sont fournis.

II.1.3.3. Sélection du matériel et des composés pour analyse

L'analyse de composition a été réalisée uniquement sur les graines. Les composés analysés correspondent à ceux du document consensus de l'OCDE (2015), complété par la recherche des stérols. Le GT « Biotechnologie » estime que cette analyse est complète.

II.1.3.4. Analyse comparative de la composition

Les mesures de 76 composés sur les 114 analysés dans les graines sont utilisables pour les analyses statistiques. Sur la base de ces résultats, l'analyse combinée de l'ensemble des 12 sites d'expérimentation montre que la composition des graines de colza LBFLFK est statistiquement différente de la variété isogénique Kumily et non équivalente à celles des variétés commerciales de référence pour les teneurs en calcium, en acides gras trans totaux et en cinq acides gras (C16:1 n-7, C18:0, C18:1 n-9, C20:1 n-9, C20:2 n-6). Des teneurs en calcium significativement plus faibles chez le colza LBFLFK (traité ou non) sont observées pour 7 sites sur 12 par rapport à celles des variétés de référence testées mais elles restent dans la plage de variation des teneurs observées dans des variétés commerciales (ILSI, 2016). Les variations des teneurs en acides gras trans totaux et des cinq acides gras listés ci-dessus sont des conséquences attendues de la transformation génétique du colza LBFLFK. Par ailleurs, le colza LBFLFK est équivalent aux variétés commerciales de référence pour les autres composés ayant pu être analysés statistiquement.

Le critère d'inclusion des composés pour l'analyse statistique était que la valeur analytique soit supérieure à la limite basse de quantification (LOQ) pour les graines de la variété isogénique, Kumily. Le but de la transformation du colza LBFLFK étant la modification du profil en acides gras des graines, les 25 acides gras présents parmi les 38 composés dont les analyses ne sont pas utilisables pour l'analyse statistique sont discutés dans le dossier. Treize acides gras parmi ces 25 (C18:3 n-6, C18:4 n-3, C20:3 n-3, C20:3 n-6, C20:3 n-9, C20:4 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:4 n-3, C22:4 n-6, C22:5 n-3, C22:5 n-6 et C22:6 n-3) ont pu être dosés dans le colza LBFLFK. Parmi ceux-ci, on retrouve l'EPA, le DHA et leurs précurseurs. Leur synthèse est en adéquation avec la transformation génétique.

Les teneurs en acides gras des graines du colza LBFLFK et la répartition pour ceux statistiquement différents entre le colza LBFLFK et la variété isogénique Kumily, ou non détectables dans la variété isogénique Kumily, sont résumées dans le tableau 3 présent au chapitre II.1.3.6.

Les graines de colza LBFLFK traité avec un herbicide d'intérêt de type imidazolinone présentent une composition similaire à celle des graines de colza LBFLFK non traité.

II.1.3.5. Analyse comparative des caractéristiques agronomiques et phénotypiques

Les caractéristiques agronomiques et phénotypiques ont été évaluées sur 21 paramètres dont 13 sont utilisables pour les analyses statistiques. En raison de la modification de la composition des graines, les caractéristiques de germination du colza LBFLFK ont été mesurées (EFSA, 2015).

A l'exception de la tolérance aux herbicides de type imidazolinone, le colza LBFLFK apparaît équivalent au témoin isogénique Kumily et aux variétés commerciales sur le plan agronomique. Les résultats des essais de germination (standard, à la chaleur et au froid) montrent des différences pour plusieurs paramètres entre les graines de colza LBFLFK (traitées ou non avec

l'herbicide d'intérêt) et celles du témoin isogénique Kumily et une non équivalence avec les graines des variétés commerciales. Ces différences sont en défaveur du colza LBFLFK ce qui conforte les observations réalisées (test de germination) à la mise en place des essais de 2016.

II.1.3.6. Effets de la transformation

Un essai au champ spécifique a été réalisé en 2016 sur 6 sites afin de préparer en conditions pilote, des produits issus du colza LBFLFK traité avec l'herbicide d'intérêt, de son témoin isogénique Kumily et de 3 variétés de référence de colza. Les produits sont le tourteau délipidé et l'huile brute destinés à l'alimentation animale, et l'huile raffinée destinée à l'alimentation humaine. La recherche des 11 protéines issues de la transformation génétique a été faite sur les 3 produits alimentaires. Pour cet essai, cinq protéines sont quantifiables dans la graine broyée, D12D(*Ps*), D6D(*Ot*), D6E(*Tp*), O3D(*Pir*) et D5E(*Ot*) et seulement trois le restent dans le tourteau délipidé, D6D(*Ot*), D6E(*Tp*), O3D(*Pir*). Aucune des 11 protéines n'est détectable dans les huiles.

L'analyse de composition des trois produits alimentaires (tourteau délipidé, huile brute et huile raffinée) montre une similarité de composition entre les tourteaux issus de graines de colza LBFLFK et ceux issus de graines Kumily, en dehors de la présence des 3 protéines exogènes. Par contre, les teneurs en protéines, cendres totales et calcium des tourteaux issus de graines LBFLFK et Kumily sont en dehors des plages de variation des tourteaux de colza de référence. Il en est de même pour la plupart des concentrations en acides aminés et pour certains facteurs antinutritionnels. Des différences de composition en acides gras sont observées entre les huiles issues de graines de colza LBFLFK et celles de graines de variété Kumily ou de graines de variétés conventionnelles et sont en accord avec les effets attendus de la transformation génétique sur le métabolisme lipidique (augmentation de la proportion d'acides gras n-3). Les proportions des acides gras n-6 par rapport aux acides gras totaux sont également augmentées (tableau 3).

Tableau 3 : Composition en acides gras des graines de colzas LBFLFK et Kumily et des produits élaborés à partir de ces graines. Les acides gras totaux sont exprimés en % de la masse de l'aliment et les différents acides gras en % des acides gras totaux.

	Aliment	Graine broyée		Tourteau délipidé		Huile brute		Huile raffinée (RBD)	
	Variété	LBFLFK	Kumily	LBFLFK	Kumily	LBFLFK	Kumily	LBFLFK	Kumily
Acide gras									
Acides gras totaux (% masse de l'aliment)		38,90	38,73	1,12	0,94	99,69	99,62	100	100
Exprimés en % des acides gras totaux de l'aliment									
Acides gras trans totaux		0,147	0,099	< LOQ	< LOQ	0,155	0,096	0,594	0,626
Acide palmitoléique	C16:1 n-7	0,184	0,283	< LOQ	< LOQ	0,168	0,247	0,173	0,245
Acide stéarique	C18:0	3,095	2,290	2,342	2,054	2,994	2,290	3,100	2,280
Acide oléique	C18:1 n-9	27,924	57,863	16,576	29,952	27,880	58,417	29,554	59,048
Acide linoléique	C18 :2 n-6	28,912	20,128	23,100	26,725	28,732	20,003	29,560	19,603
Acide isolinoléique	C18:2 n-9	1,306	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,321	0,026	1,428	0,065
Acide alpha-linolénique	C18:3 n-3	5,014	8,177	3,958	5,433	5,221	8,273	4,916	7,446
Acide gamma-linolénique	C18:3 n-6	2,324	< LOQ	1,741	< LOQ	2,348	< LOQ	2,211	< LOQ

	Aliment	Graine broyée		Tourteau délipidé		Huile brute		Huile raffinée (RBD)	
	Variété	LBFLFK	Kumily	LBFLFK	Kumily	LBFLFK	Kumily	LBFLFK	Kumily
	Acide gras								
Acide stéaridonique (SDA)	C18:4 n-3	0,316	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,356	< LOQ	0,314	< LOQ
	C20:1 n-9	0,750	1,090	< LOQ	< LOQ	0,748	1,106	0,795	1,117
	C20:2 n-6	0,117	0,065	< LOQ	< LOQ	0,113	0,070	0,114	0,058
	C20:2 n-9	0,359	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,338	< LOQ	0,373	0,035
	C20:3 n-3	0,058	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,065	< LOQ	0,062	< LOQ
	C20:3 n-6	5,205	< LOQ	5,818	< LOQ	5,199	< LOQ	4,959	< LOQ
	C20:3 n-9	0,043	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,055	< LOQ	0,047	< LOQ
	C20:4 n-3	2,133	< LOQ	3,140	< LOQ	2,222	< LOQ	1,912	< LOQ
Acide arachidonique	C20 :4 n-6	2,006	< LOQ	1,377	< LOQ	2,057	< LOQ	1,747	< LOQ
Acide eicosapentaénoïque (EPA)	C20:5 n-3	5,105	< LOQ	2,854	< LOQ	5,390	< LOQ	4,132	< LOQ
	C22:4 n-3	1,142	< LOQ	1,480	< LOQ	1,173	< LOQ	1,021	< LOQ
	C22:4 n-6	0,586	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,599	< LOQ	0,530	< LOQ
	C22:5 n-3	2,749	< LOQ	2,762	< LOQ	2,915	< LOQ	2,225	< LOQ
	C22:5 n-6	0,072	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,065	< LOQ	0,052	< LOQ
Acide docosahexaénoïque (DHA)	C22:6 n-3	0,490	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,512	< LOQ	0,358	< LOQ

II.1.3.7. Conclusions de l'évaluation comparative

Sur la base des éléments présentés dans le dossier et à l'exception de sa tolérance aux herbicides de type imidazolinone, le colza LBFLFK est équivalent à la variété isogénique Kumily et aux variétés commerciales sur le plan agronomique. Comme attendu du fait de la transformation génétique dans le but d'obtenir un profil modifié en acides gras, il n'est pas équivalent à son témoin isogénique Kumily, ni aux variétés commerciales de référence pour la composition en acides gras des graines.

Les caractéristiques de germination du colza LBFLFK sont impactées négativement en comparaison du témoin isogénique et des variétés commerciales.

Les huiles issues de graines de colza LBFLFK présentent des compositions en acides gras modifiées en accord avec les effets attendus de la transformation génétique. En dehors de la présence de protéines exogènes, les tourteaux issus des graines de colza LBFLFK présentent une composition similaire aux tourteaux issus de graines de colza témoin Kumily mais différente de celle des tourteaux issus de graines de colza de référence.

Dans ces conditions, le GT « Biotechnologie » estime qu'une évaluation nutritionnelle est nécessaire pour renseigner la sécurité du colza LBFLFK.

II.1.4. Toxicologie

II.1.4.1. Analyse des protéines nouvellement exprimées

Le colza LBFLFK est modifié génétiquement dans le but d'exprimer 11 protéines exogènes, la protéine AHAS(At)[A122T S653N] et 10 protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés à longue chaîne.

Le pétitionnaire a réalisé une analyse bibliographique sur les 11 protéines nouvellement exprimées dans le colza LBFLFK.

Les données de sécurité sur les organismes sources, les recherches bioinformatiques d'homologies de séquences entre les 11 protéines et les allergènes et toxines connus, la dégradabilité des protéines par les enzymes digestives, la thermosensibilité des protéines et leurs teneurs dans les graines et différents produits consommables ainsi que l'analyse faite par le GT « Biotechnologie » sont détaillés dans les chapitres sur l'allergénicité (chapitre II.1.5), sur la caractérisation moléculaire de la plante génétiquement modifiée (chapitre II.1.2.2) et sur les effets de la transformation (chapitre II.1.3.6).

Le pétitionnaire présente des essais de production pour les 10 protéines du métabolisme lipidique exogènes dans différents systèmes d'expression. Ils n'ont pas permis de générer des quantités suffisantes pour pouvoir réaliser des études de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez le rongeur. Les protéines D12D(*Ps*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), O3D(*Pi*), O3D(*Pir*), D6E(*Pp*), D6E(*Tp*), D5E(*Ot*) ont ensuite été produites par transcription et traduction *in vitro*. Cette méthode conduit à la production de protéines insolubles, vraisemblablement non fonctionnelles et dans des quantités insuffisantes pour réaliser des études de toxicité.

Le pétitionnaire documente la sécurité de la protéine AHAS(At)[A122T S653N] entre autres avec de la bibliographie sur différentes plantes portant une tolérance aux herbicides de type imidazolinone via l'expression de protéines AHAS mutées (Tan *et al.*, 2005 ; Mathesius *et al.*, 2009 ; Chukwudebe *et al.*, 2012 et EFSA, 2014). Dans l'article de Mathesius *et al.* (2009), la protéine GM-HRA (AHAS de soja mutée) a été produite dans *Escherichia coli* afin de réaliser une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez la souris. La production de la protéine AHAS(At)[A122T S653N] dans un système d'expression devrait donc être envisagée afin de pouvoir conduire une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez le rongeur et renseigner la sécurité de cette nouvelle protéine.

Aucune argumentation sur les interactions potentielles entre les 11 protéines du métabolisme lipidique n'est présentée dans le dossier.

Le GT « Biotechnologie » estime aussi qu'il serait souhaitable de réaliser une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez le rongeur avec la graine de colza LBFLFK. Elle permettrait de pallier les difficultés de production individuelle des 10 protéines du métabolisme lipidique nouvellement exprimées et d'évaluer les effets de leurs interactions potentielles.

II.1.4.2. Analyse des nouveaux constituants autres que les protéines

La voie de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne exprimée dans les graines du colza LBFLFK modifie la composition lipidique des graines de colza en variant la concentration en acides gras trans totaux et la représentation d'acides gras existants dans le colza conventionnel (C16:1 n-7, C 18:0, C18:1 n-9, C 18:2 n-9, C20:1 n-9, C20:2 n-6 et C20:2 n-9) et en permettant la synthèse de nouveaux acides gras (C18:3 n-6, C18:4 n-3, C20:3 n-3, C20:3 n-6, C20:3 n-9, C20:4 n-3, C20:4 n-6, C20:5 n-3, C22:4 n-3, C22:4 n-6, C22:5 n-3, C22:5 n-6 et C22:6 n-3). La composition en acides gras des graines est présentée dans le tableau 3 au chapitre II.1.3.6.

Un schéma élaboré par le GT « Biotechnologie » et présenté en annexe illustre la voie majeure et les voies mineures de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à partir de l'acide oléique,

existantes dans les graines du colza LBFLFK. L'indication des activités enzymatiques correspondant aux protéines nouvellement exprimées est issue des données de conversion d'acides gras par réaction des protéines exprimées individuellement chez la levure (Yilmaz *et al.*, 2017). De plus, la capacité de réaliser les différentes étapes de la voie principale de biosynthèse de l'acide oléique jusqu'au DHA a été vérifiée *in vitro*, étape par étape en ajoutant les différents substrats réactionnels et des extraits protéiques de fractions membranaires de graines immatures de colza LBFLFK. Les activités enzymatiques endogènes présentes dans le colza non génétiquement modifié sont aussi figurées sur le schéma.

Le pétitionnaire présente une analyse bibliographique pour étayer la sécurité du colza LBFLFK dont un article scientifique publié dans une revue à comité de lecture qui porte sur une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez le rat, destinée à renseigner la sécurité de l'huile raffinée, blanchie et désodorisée (huile RBD) de colza LBFLFK (Andre *et al.*, 2019). Chaque rat (10 rats/sexe/traitement) reçoit quotidiennement par gavage 3 ml d'huile/kg de poids corporel. Pour tester la sécurité de l'huile de colza LBFLFK, cette étude met en œuvre une dose forte (100 % de l'huile distribuée est issue de graines de colza LBFLFK) et une dose faible (33 % de l'huile provient de graines de colza LBFLFK et 67 % de graines de colza Kumily). Deux témoins sont utilisés : l'huile extraite de graines de colza non transformé Kumily et l'huile menhaden (huile de poisson commerciale). Cette étude conclut à une absence d'effet toxique en lien avec une consommation d'huile RBD de colza LBFLFK. Cependant, en l'absence des données complètes et du rapport d'étude original, le GT « Biotechnologie » ne peut pas se prononcer sur ses conclusions.

II.1.4.3. Informations sur les constituants naturels de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux

Une étude a été conduite en 2016 pour préparer des produits semblables à ceux destinés à l'alimentation animale et humaine dans des conditions pilote : tourteau, huile pression à froid, huile brute et huile RBD. Ces produits ont été analysés pour leur composition complète et la recherche des protéines nouvellement synthétisées dans le colza LBFLFK. Les résultats sont discutés au chapitre II.1.3.6.

II.1.4.4. Analyse de l'aliment (denrée alimentaire ou aliment pour animaux) génétiquement modifié entier

Une étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le rat a été menée en 2019 selon un protocole s'appuyant sur la ligne directrice OCDE 408 (1998) et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Les données brutes sous format électronique et le programme de calcul ne sont pas fournis.

Cinq groupes de 16 rats mâles et 16 rats femelles, lignée Wistar, ont été nourris avec des régimes alimentaires contenant :

- 15 % (p/p) de tourteau délipidé et 4 % d'huile raffinée, blanchie et désodorisée (huile RBD) de la variété génétiquement modifiée LBFLFK,
- 15 % (p/p) de tourteau délipidé et 2 % d'huile RBD de la variété génétiquement modifiée LBFLFK auquel s'ajoute 2 % d'huile RBD de la variété isogénique Kumily,
- 15 % (p/p) de tourteau délipidé et 4 % d'huile raffinée, blanchie et désodorisée (huile RBD) de la variété isogénique Kumily,
- 15 % (p/p) de tourteau délipidé et 4 % d'huile raffinée, blanchie et désodorisée (huile RBD) pour deux variétés commerciales non génétiquement modifiées 46A65 et IMC105.

Le colza LBFLFK utilisé dans cette étude a été traité avec un herbicide d'intérêt de type imidazolinone. Les analyses réalisées sur les aliments distribués aux différents groupes d'animaux montrent qu'ils sont équivalents sur le plan nutritionnel et en termes de teneurs en contaminants. Le choix de la dose d'incorporation de 15 % de tourteau délipidé est basé sur le calcul de la dose

maximale en glucosinolates, composés antinutritionnels, ne provoquant pas de déséquilibre nutritionnel. Les données individuelles de l'étude et les données historiques du centre investigateur sont présentées.

L'étude de toxicité subchronique conduite avec l'aliment complet chez le rat n'a pas permis de mettre en évidence d'effets toxiques imputables au traitement, dans les conditions de l'étude, ni de modifications macroscopiques ou histologiques imputables au traitement.

Le calcul de puissance n'est effectué que pour neuf paramètres biologiques. Le pétitionnaire démontre que le nombre d'animaux choisis (16) permet de mesurer, avec une puissance de 80 %, des tailles d'effets compris entre 15 et 30 % [ce qui paraît acceptable, comme mentionné par l'US EPA (2002)]. Cependant, le pétitionnaire utilise par la suite dans son analyse des données, une correction pour tests multiples de Bonferroni qui n'est pas prise en compte dans ce calcul de puissance et qui conduit à une diminution de la puissance réelle de l'étude (van der Voet, 2018). Le calcul de puissance doit donc être refait pour l'ensemble des paramètres de l'étude, en prenant en compte la correction pour tests multiples (qui devra être préférentiellement le false discovery rate) ou l'analyse des données doit être refaite sans correction pour tests multiples. Le GT « Biotechnologie » considère par conséquent que le calcul de puissance n'est pas valide.

II.1.4.5. Conclusions de l'évaluation toxicologique

L'évaluation des éléments présentés sur la sécurité des protéines D12D(*Ps*), D6D(*Ot*), D5D(*Tc*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), O3D(*Pi*), O3D(*Pir*), D6E(*Pp*), D6E(*Tp*), D5E(*Ot*) et AHAS(*At*)[A122T S653N] ne met pas en évidence d'informations conduisant à suspecter un effet toxique sur la santé humaine et animale. Aucune étude de toxicité par administration répétée pendant 28 jours chez la souris n'a été conduite sur les protéines nouvellement exprimées. La littérature présentant une étude de toxicité par administration orale répétée pendant 28 jours chez la souris réalisée avec une autre acétohydroxyacide synthétase mutée, la production de la protéine AHAS(*At*)[A122T S653N] dans un système d'expression devrait donc être envisagée afin de pouvoir conduire une étude de toxicité et documenter la sécurité de cette protéine.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du colza LBFLFK sur la base de l'étude de toxicité orale subchronique pendant 90 jours présente dans le dossier.

II.1.5. Allergénicité

II.1.5.1. Évaluation de l'allergénicité des protéines nouvellement exprimées

Le potentiel allergénique des 11 protéines nouvellement exprimées dans le colza LBFLFK a été évalué selon les critères d'évaluation de l'allergénicité recommandés par l'EFSA (2017a), à savoir :

- l'innocuité des sources de protéines exprimées dans la plante génétiquement modifiée,
- l'absence d'homologies de séquences entre ces protéines et des allergènes ou toxines connus lorsque la recherche est effectuée avec l'algorithme FASTA et des fenêtres glissantes de 80 et 8 résidus,
- la dégradation des protéines exprimées par la pepsine et la trypsine dans des tests de digestions gastrique et intestinale simulées,
- la thermosensibilité des protéines exprimées,
- la faible teneur en protéines nouvellement exprimées dans la plante génétiquement modifiée.

Les organismes sources des séquences codant les différentes protéines nouvellement exprimées sont *Arabidopsis thaliana* pour la protéine AHAS(*At*)[A122T S653N] et pour les protéines du métabolisme lipidique, des micro-algues marines (*Ostreococcus tauri*, *Pavlova lutheri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Thraustochytrium* sp.), des oomycètes (*Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae* et *Pythium irregulare*) et une mousse (*Physcomitrella patens*). Selon le pétitionnaire, aucun de ces organismes n'est à l'origine de réactions allergiques. Le

GT « Biotechnologie » remarque que des séquences de protéines à caractère allergénique ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana*. Toutefois, cette plante n'est pas considérée comme une source d'allergènes majeure.

Les analyses bioinformatiques ne mettent pas en évidence d'identité de séquences globale ou locale entre les 11 protéines et des protéines toxiques et allergiques avérées et répertoriées dans des bases de données actualisées (2019). Aucune information ne conduit à suspecter des propriétés adjuvantes à ces protéines.

La recherche de peptides immunotoxiques potentiels (non IgE-mediated adverse immune reactions to food) associés à la maladie cœliaque est négative pour 10 des protéines nouvellement exprimées. La protéine D6D(*Ot*) présente une identité partielle avec un peptide DQ2-spécifique d'alpha2-gliadine. La séquence présente sur la protéine D6D(*Ot*) comporte trois substitutions d'acides aminés (aa) sur un peptide de 9 aa et la présence d'un site de clivage par la trypsine. L'analyse du docking moléculaire de ce peptide dans la corbeille des groupes HLA-DQ2 (code PDB 1S9V) et HLA-DQ8 (code PDB 4GG6) effectuée par le GT « Biotechnologie » montre que l'ancrage de ce peptide ne serait que partiel et non susceptible de déclencher une réponse immunotoxique.

La protéine AHAS(*At*)[A122T S653N] est une enzyme soluble et chloroplastique. Les 10 protéines impliquées dans le métabolisme lipidique sont des enzymes hydrophobes et membranaires.

Les enzymes D12D(*Ps*), D6D(*Ot*), D5D(*Tc*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), O3D(*Pir*), D6E(*Tp*), D5E(*Ot*) et AHAS(*At*)[A122T S653N] sont présentes dans les fractions membranaires purifiées à partir de graines immatures. Les enzymes O3D(*Pl*) et D6E(*Pp*) ne sont pas détectables dans ces fractions. La protéine AHAS(*At*)[A122T S653N] a aussi été purifiée à partir de feuilles. Ces fractions protéiques ont été utilisées pour réaliser des études de digestibilité des protéines. Toutes les protéines testées montrent une faible résistance à la dégradation pepsique et trypsique (tests de digestion gastrique et intestinale simulée *in vitro*). Le GT « Biotechnologie » a complété ces résultats expérimentaux par la recherche bioinformatique des sites de clivage par la pepsine et la trypsine sur les modèles tridimensionnels des protéines D12D(*Ps*), D6D(*Ot*), D5D(*Tc*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), O3D(*Pl*), O3D(*Pir*) et AHAS(*At*)[A122T S653N]. Cette recherche montre l'existence de nombreux sites de clivage accessibles aux enzymes digestives sur ces protéines modélisées. Les trois élongases comportant des segments transmembranaires ne peuvent faire l'objet de cette analyse bioinformatique.

La thermostabilité des protéines nouvellement exprimées a été déterminée expérimentalement après incubation suivie de migration SDS-Page et Western blot avec des anticorps polyclonaux spécifiques des 11 protéines. Quatre températures différentes (30 °C, 50 °C, 70 °C, 90 °C) ont été testées afin de déterminer les températures d'inactivation et de dégradation des enzymes. Les enzymes D12D(*Ps*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), D6E(*Tp*), D6E(*Pp*), D5E(*Ot*) et AHAS(*At*)[A122T S653N] sont inactivées à partir de 50 °C, 20 min. Les enzymes D12D(*Ps*), D6D(*Ot*), D5D(*Tc*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), O3D(*Pir*), D6E(*Tp*), D5E(*Ot*) et AHAS(*At*)[A122T S653N] sont dénaturées au-dessus de 70 °C.

Les teneurs en protéines ont été mesurées dans les graines immatures et matures de colza LBFLFK et de colzas témoins (chapitre II.1.2.2) ainsi que dans les graines matures et les huiles destinées à l'alimentation humaine : huile pression à froid et huile RBD (chapitre II.1.3.6). Les teneurs en protéines dans les huiles testées sont toutes inférieures à la limite de détection.

Les 11 protéines nouvellement exprimées dans le colza LBFLFK satisfont globalement aux différents critères d'évaluation de l'allergénicité proposés par l'EFSA et peuvent donc être considérées comme étant peu allergéniques.

II.1.5.2. Évaluation de l'allergénicité de la plante génétiquement modifiée entière
Aucune des informations disponibles au sujet du colza LBFLFK ne laisse supposer que ce colza puisse développer une allergénicité différente de celle des variétés de colza conventionnelles.

II.1.5.3. Conclusions de l'évaluation de l'allergénicité
Sur la base des données et des commentaires fournis par le pétitionnaire, le potentiel allergénique des protéines D12D(*Ps*), D6D(*Ot*), D5D(*Tc*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), O3D(*Pi*), O3D(*Pir*), D6E(*Pp*), D6E(*Tp*), D5E(*Ot*) et AHAS(*At*)[A122T S653N] exprimées dans le colza LBFLFK peut être considéré comme très faible. Par ailleurs, ces protéines n'ont apparemment pas de propriétés adjuvantes.
Enfin, l'allergénicité du colza LBFLFK reste vraisemblablement identique à celle d'un colza conventionnel.

II.1.6. Evaluation nutritionnelle

II.1.6.1. Évaluation nutritionnelle des denrées alimentaires génétiquement modifiées
Le pétitionnaire a réalisé une étude de comparaison de profils en acides gras de différentes sources de lipides pour l'alimentation humaine. Les différences de composition entre l'huile de colza LBFLFK et des huiles de colza de variétés conventionnelles sont très importantes. Une réflexion pourrait être menée pour savoir si cette huile est équivalente à d'autres denrées alimentaires consommées en Europe ou est à considérer en tant que potentiel nouvel aliment au titre du règlement (UE) 2015/2283.

II.1.6.2. Évaluation nutritionnelle des aliments pour animaux génétiquement modifiés
Bien que les compositions du colza LBFLFK et des variétés de colza conventionnelles ne soient pas équivalentes, le pétitionnaire n'a pas réalisé d'évaluation nutritionnelle chez les animaux de rente estimant que les différences constatées dans la composition du colza LBFLFK sont celles recherchées via la transformation génétique. Le GT « Biotechnologie » considère que des études nutritionnelles chez l'animal cible sont nécessaires. Elles devraient être conduites chez le poulet et chez le poisson, animal ciblé pour la consommation de l'huile de colza LBFLFK. Une étude chez le poisson devrait être conduite pour évaluer les effets de l'huile de colza LBFLFK sur la croissance des poissons et la composition en acides gras de la chair afin d'estimer l'impact potentiel sur la qualité nutritionnelle des denrées destinées à l'alimentation humaine.

II.1.6.3. Conclusions de l'évaluation nutritionnelle
Le GT « Biotechnologie » considère que des études d'évaluation nutritionnelle devraient être conduites sur les animaux cibles en raison de l'absence d'équivalence de composition entre le colza LBFLFK et les colzas conventionnels.

II.2 Évaluation de l'exposition - Prévision de la quantité consommée ou de l'étendue de l'utilisation

Le pétitionnaire présente des évaluations des expositions alimentaires au colza LBFLFK pour l'animal et l'Homme.

L'huile de colza LBFLFK serait destinée à l'alimentation humaine et aux poissons d'élevage comme source d'EPA et de DHA. Le tourteau délipidé de colza LBFLFK aurait une destination alimentaire semblable aux autres tourteaux de colza.

L'estimation de la consommation journalière aux protéines exogènes chez l'animal est fondée sur les données de l'OCDE (2013) relatives à la consommation de colza par les animaux d'élevage et un scénario du "pire des cas". Dans ces conditions, les apports journaliers les plus élevés sont obtenus chez les dindes en considérant une proportion de 20 % de tourteau de colza dans la ration. Ce scénario correspondrait à une ingestion de 346 µg/kg p.c./jour de D6D(*Ot*), 12,1 mg/kg p.c./jour de D6E(*Tp*) et de 5,01 mg/kg p.c./jour de O3D(*Pir*), les 3 seules protéines quantifiées dans les tourteaux délipidés de colza LBFLFK (chapitre II.1.3.6).

L'estimation de la consommation chronique et aiguë par l'Homme est fondée sur l'utilisation de l'EFSA European Comprehensive Food Consumption Database³. L'exposition aux 11 protéines exogènes est considérée comme négligeable, les protéines n'étant pas détectables dans l'huile.

II.3 Caractérisation des risques

Non documentée par le pétitionnaire.

II.4 Surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié(e) consécutive à sa mise sur le marché

Le pétitionnaire n'a pas proposé de plan de surveillance de la denrée alimentaire ou de l'aliment pour animaux génétiquement modifié consécutive à sa mise sur le marché.

II.7 Informations complémentaires sur la sécurité des denrées et des aliments pour animaux génétiquement modifiés

Le pétitionnaire a procédé à une analyse de la littérature sur la période 2016-2019, dont il détaille les modalités et les résultats dans un rapport. Il indique avoir suivi les recommandations de l'EFSA (2017b) pour procéder à cette revue systématique de la littérature.

La formulation de la question, la recherche par mots clés, les combinaisons des termes et les opérateurs booléens sont appropriés.

Les bases de données utilisées par le pétitionnaire sont pertinentes et couvrent largement les domaines scientifiques nécessaires à la revue systématique du colza LBFLFK. Les critères d'inclusion pour la sélection des articles sont décrits mais jugés trop restrictifs dans la mesure où ils se limitent au colza LBFLFK, événement récent.

Le pétitionnaire a fait appel à 2 « reviewers » pour conduire cette analyse de façon indépendante. Le GT « Biotechnologie » regrette que l'organisme d'appartenance de ces « reviewers » ne soit pas renseigné, ce qui ne permet pas de juger de leur niveau d'indépendance par rapport au pétitionnaire. Il n'est pas fait mention d'un test de cohérence d'analyse entre les 2 « reviewers ».

Conclusions du Groupe de travail « Biotechnologie »

La caractérisation moléculaire du colza LBFLFK ne soulève pas de question particulière liée à son utilisation en alimentation animale ou humaine.

A l'exception de sa tolérance aux herbicides de type imidazolinone, le colza LBFLFK est équivalent à la variété isogénique Kumily et aux variétés commerciales sur le plan agronomique. Comme attendu du fait de la transformation génétique dans le but d'obtenir un profil modifié en acides gras, il n'est pas équivalent à son témoin isogénique Kumily, ni aux variétés commerciales de référence pour la composition en acides gras des graines.

Les huiles issues de graines de colza LBFLFK présentent des compositions en acides gras modifiées en accord avec les effets attendus de la transformation génétique. En dehors de la présence de protéines exogènes, les tourteaux issus des graines de colza LBFLFK présentent une composition similaire aux tourteaux issus de graines de colza témoin Kumily mais différente de celle des tourteaux issus de graines de colza de référence.

Le GT « Biotechnologie » n'est pas en mesure de se prononcer sur la sécurité du colza LBFLFK au regard des données toxicologiques présentées.

Le potentiel allergénique des protéines nouvellement exprimées dans le colza LBFLFK peut être considéré comme très faible. Par ailleurs, ces protéines n'ont apparemment pas de propriétés

³ <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>

adjuvantes. L'allergénicité du colza LBFLFK reste vraisemblablement identique à celle d'un colza conventionnel.

Le GT « Biotechnologie » considère que des études d'évaluation nutritionnelle devraient être conduites sur des animaux cibles en raison de l'absence d'équivalence de composition entre le colza LBFLFK et les colzas conventionnels.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du GT « Biotechnologie » et émet un avis défavorable sur la demande d'autorisation de mise sur le marché du colza LBFLFK au titre du Règlement (CE) n° 1829/2003. Cet avis défavorable est fondé sur le caractère incomplet ou imprécis du dossier fourni par le pétitionnaire qui, en l'état, ne répond pas pleinement aux exigences du Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013.

Sachant que des études ou données complémentaires pourraient être versées au dossier à la demande de l'EFSA, le contenu du présent avis ne préjuge pas des conclusions qui pourraient être rendues ultérieurement par l'Anses au vu d'un dossier complété pour répondre pleinement aux exigences du Règlement européen.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

OGM, colza LBFLFK, tolérance aux herbicides de type imidazolinone, acides gras, EPA, DHA, D12D(*Ps*), D6D(*Ot*), D5D(*Tc*), D4D(*Tc*), D4D(*Pl*), O3D(*Pl*), O3D(*Pir*), D6E(*Pp*), D6E(*Tp*), D5E(*Ot*), AHAS(*At*)[A122T S653N]

GMO, LBFLFK canola, tolerance to imidazolinone herbicides, fatty acids, EPA, DHA, D12D(Ps), D6D(Ot), D5D(Tc), D4D(Tc), D4D(Pl), O3D(Pl), O3D(Pir), D6E(Pp), D6E(Tp), D5E(Ot), AHAS(At)[A122T S653N]

BIBLIOGRAPHIE

Andre C, Buesen R, Riffle B, Wandelt C, Sottosanto J B, Marxfeld H, Strauss V, van Ravenzwaay B, Lipscomb E A. 2019. "Safety assessment of EPA + DHA canola oil by fatty acid profile

comparison to various edible oils and fat-containing foods and a 28-day repeated dose toxicity study in rats". *Food and chemical toxicology* 124, 168-181.

Chukwudebe A, Privalle L, Reed A, Wandelt C, Contri D, Dammann M, Groeters S, Kaspers U, Strauss V, van Ravenzwaay B. 2012. "Health and nutritional status of Wistar rats following subchronic exposure to CV127 soybeans". *Food and chemical toxicology* 50, 956-971.

EFSA GMO Panel. 2006. "Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed." *EFSA Journal* 99: 1-100.

EFSA GMO Panel. 2010. "Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. The *EFSA Journal* 2010; 8(1): 1250.

EFSA GMO Panel. 2011. "Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants." *EFSA Journal* 9(5): 2150, 37 pp.

EFSA GMO Panel. 2014. "Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-NL-2009-64) for the placing on the market of herbicide-tolerant genetically modified soybean BPS-CV127-9 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from BASF Plant Science". *EFSA Journal* 12(1):3505, 30 pp.

EFSA. 2017a. "Guidance on allergenicity assessment of genetically modified plants". *EFSA Journal* 15: 1–49.

EFSA, Devos Y, Guajardo IM, Glanville J and Waigmann E. 2017b. "Explanatory note on literature searching conducted in the context of GMO applications for (renewed) market authorisation and annual post-market environmental monitoring reports on GMOs authorised in the EU market". *EFSA supporting publications* 14(4), EN-1207, 1–48.

ILSI, 2016. Online. International life sciences institute crop composition database, Version 6. Accessed on may 15, 2017. Available at <https://www.cropcomposition.org/query/index.html>

ISAAA. 2018. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change. *ISAAA Brief* No. 54. ISAAA: Ithaca, NY.

Mathesius C A, Barnett Jr J F, Cressman R F, Ding J, Carpenter C, Ladics G S, Schmidt J, Layton R J, Zhang J X Q, Appenzeller L M, Carlson G, Ballou S, Delaney B. 2009. « Safety assessment of a modified acetolactate synthase protein (GM-HRA) used as a selectable marker in genetically modified soybeans". *Regulatory toxicology and pharmacology* 55, 309-320.

NF X50-110:2003 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

OCDE. 1998. « Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours », Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Editions OCDE, Paris.

OCDE. 2013. "Guidance Document on Residues in Livestock." Series on Pesticides, No. 73. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), Paris (France).

OCDE. 2015. Safety Assessment of Foods and Feeds Derived from Transgenic Crops, Volume 2, Novel Food and Feed Safety, Editions OCDE, Paris.

Règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. JO L 268 du 18.10.2003, pp. 1-23.

Règlement (UE) 2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) n°258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n°1852/2001 de la Commission.

Règlement d'exécution (UE) n° 503/2013 de la Commission du 3 avril 2013 relatif aux demandes d'autorisation de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux génétiquement modifiés introduites en application du règlement (CE) n° 1829/2003 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements de la Commission (CE) n° 641/2004 et (CE) n° 1981/2006. JO L 157 du 8.6.2013, pp. 1-48.

Tan S, Evans R R, Dahmer M L, Singh B K, Shaner D L. 2005. "Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future." *Pest management science* 61, 246-257.

US EPA 2002 - Guidelines for Ensuring and Maximizing the Quality, Objectivity, Utility, and Integrity of Information Disseminated by the Environmental Protection Agency








van der Voet H. 2018. "Safety assessments and multiplicity adjustment: Comments on a recent paper". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (9), 2194-2195.

Yilmaz J L, Lim Z L, Beganovic M, Breazeale S, Andre C, Stymne S, Vrinten P, Senger T. 2017. "Determination of Substrate Preferences for Desaturases and Elongases for Production of Docosahexaenoic Acid from Oleic Acid in Engineered Canola » *Lipids* 52, 207-222.

ANNEXE

Voie majeure et voies mineures de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à partir de l'acide oléique, existantes dans les graines du colza LBFLFK

Légende :

Forme	Signification
	Nom de l'acide gras
	Dans le trapèze vert se trouvent les acides gras présents aussi dans les colzas non GM : C18:1 n-9, C18:2 n-9, C20:2 n-9, C18:2 n-6 et C18:3 n-3
	Réaction enzymatique due à une des 10 protéines exogènes, dans la voie majeure de synthèse de l'acide oléique au DHA dans le colza LBFLFK
	Réaction enzymatique due à une enzyme présente dans le colza non GM (protéine endogène du colza)
	Réaction enzymatique additionnelle due à une des 10 protéines nouvellement exprimées, dans la synthèse d'un acide gras à partir de l'acide oléique dans le colza LBFLFK
	Nom de la protéine nouvellement exprimée responsable de la réaction enzymatique dans la voie majeure de synthèse de l'acide oléique au DHA dans le colza LBFLFK
	Nom de la protéine nouvellement exprimée responsable de la réaction enzymatique additionnelle dans la synthèse d'un acide gras à partir de l'acide oléique dans le colza LBFLFK

